



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift  
⑩ DE 196 34 793 A 1

⑤1 Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**C 07 C 323/59**  
C 07 C 229/22  
// C07C 203/04

②1 Akt nz ichen: 196 34 793.9  
②2 Anmeldetag: 29. 8. 96  
④3 Offenlegungstag: 5. 3. 98

DE 196 34 793 A 1

⑦1 Anmelder:  
Schwarz Pharma AG, 40789 Monheim, DE

⑦2 Erfinder:  
Erfinder wird später genannt werden

⑤6 Entgegenhaltungen:  
EP 4 51 760 A1

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 S- und O-Nitratoacylverbindungen

DE 196 34 793 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 01. 98 702 070/218

6/23

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft neue organische Nitrate und Verfahren zu deren Herstellung.

Organische Nitrate (Salpetersäureester) sind bewährte Arzneistoffe zur Behandlung von Herzerkrankungen. Sie entfalten ihre Wirkung sowohl durch eine Herzentlastung über eine Senkung von Vor- und Nachlast als auch eine Verbesserung der Sauerstoffversorgung für das Herz über eine Erweiterung der Koronarien.

In den vergangenen Jahren wurde jedoch festgestellt, daß die in der Therapie eingesetzten klassischen organischen Nitrate wie Glyceroltrinitrat, Isosorbiddinitrat oder Isosorbid-5-mononitrat bei kontinuierlicher Zufuhr hoher Dosen innerhalb kurzer Zeit eine deutliche Abschwächung der Wirkung, die Nitrattoleranz, aufweisen.

EP 0 362 575 A1, EP 0 451 760 A1 und WO 95/00477 A1 offenbaren Nitrate, welche keine Nitrattoleranz entwickeln. Die beschriebenen Verbindungen sind alle aus Nitratalkansäuren und schwefelhaltigen Aminosäuren oder Peptiden zusammengesetzt, wobei die Carboxylgruppen der Nitratalkansäure mit der Aminogruppe der Aminosäure oder des Peptides zu einem Säureamid verknüpft sind.

Die vorliegende Erfindung betrifft neue organische Nitratverbindungen, welche eine oder mehrere Nitratalkansäuren und Aminosäuren oder Peptide mit mindestens einer Thiol- oder Hydroxylgruppe oder Thiosalicylsäure enthalten, wobei mindestens eine Nitratalkansäure mit der Thiol- oder Hydroxylgruppe der Aminosäure oder des Peptides oder mit der Thiolgruppe der Thiosalicylsäure verestert ist. Überraschenderweise wurde für diese Verbindungen gefunden, daß sie bereits in geringer Konzentration äußerst wirksam sind und insbesondere die Thrombozytenaggregation stark hemmen.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind:

N-Benzoyl-O-[2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)-1-oxopropyl]-L-serin-ethylester  
 N,O-Di-[2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)-1-oxopropyl]-L-serin-ethylester  
 N,S-Di-[2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)-1-oxopropyl]-L-cystein-ethylester  
 N,S-Di-[2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)-1-oxopropyl]-L-cysteinamid  
 N-Acetyl-S-[2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)-1-oxopropyl]-L-cystein-ethylester  
 N,S-Di-[2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)-1-oxopropyl]-L-cystein-cyclohexylester  
 N-Benzoyl-S-[2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)-1-oxopropyl]-L-cystein-ethylester  
 N-Acetyl-S-[2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)-1-oxopropyl]-L-cystein-cyclohexylester  
 S-[2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)-1-oxopropyl]-2-mercaptobenzoessäure  
 N,S-Di-[2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)-1-oxopropyl]-L-cystein-tert.-butylester

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

Alle Verbindungen wurden mittels Protonen-entkoppelter  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie (200 MHz-Spektrometer) charakterisiert. Die angegebenen Resonanzsignale sind bezogen auf  $\text{CDCl}_3$  (77.10 ppm) bzw.  $\text{CD}_3\text{OD}$  (49.00 ppm). Soweit Feststoffe erhalten wurden, sind auch die Schmelzpunkte angegeben.

## Beispiel 1

## Darstellung von N,S-Di-[2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)-1-oxopropyl]-L-cystein-ethylester

Zu einer auf  $2^\circ\text{C}$  gekühlten Lösung von 8,8 g (30,0 mmol) N-(3-Nitratopivaloyl)-L-cysteinethylester in 50 ml Dichlormethan wurden unter Rühren eine Lösung von 5,7 g (31,5 mmol) 3-Nitratopivaloylchlorid in 20 ml Dichlormethan zugegeben, wobei die Temperatur auf  $9^\circ\text{C}$  ansteigt. Hierzu wurde unter Rühren eine Lösung von 3,2 g (31,5 mmol) Triethylamin gelöst in 20 ml Dichlormethan unter Eisbadkühlung in ca. 15 Minuten zugetropft (exotherm und Triethylammoniumhydrochlorid fällt aus). Zur Vervollständigung der Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung nacheinander zweimal mit je 10 ml 1 N Salzsäure, einmal mit 10 ml einer ca. 9%igen wäßrigen Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit 10 ml entmineralisiertem Wasser gewaschen. Die Dichlormethan-Phase wurde am Rotations-Verdampfer bis zur Gewichtskonstanz eingengt. Der verbleibende ölige Rückstand von 13,2 g wurde durch präparative Säulenchromatographie mit einem Eluenten von 80 Methanol und 20 Wasser (V/V) über eine  $\text{RP}_{18}$ -Säule getrennt. Die das Titelprodukt enthaltene Fraktion wurde am Rotations-Verdampfer eingengt. Der Rückstand wurde zur azeotropen Trocknung in 100 ml Ethylacetat gelöst und erneut am Rotavapor bis zur Gewichtskonstanz eingengt, wobei ein farbloser ölgiger Rückstand von 9,2 g N,S-Di-(3-nitratopivaloyl)-L-cystein-ethylester übrig bleibt ( $\approx 69,8\%$  der Theorie).

Elementaranalyse berechnet:

C 41.00%; H 5.73%; N 9.56%; O 36.41%; S 7.30%;

Elementaranalyse gefunden:

C 40.94%; H 5.79%; N 9.6%; O 36.5%; S 7.15%.

$^{13}\text{C}$ -NMR( $\text{CDCl}_3$ ): 14.07, 22.29, 22.45, 22.69, 22.76, 30.14, 41.94, 49.29, 52.55, 62.22, 77.26, 78.00, 169.79, 174.18, 203.03.

## Beispiel 2

## Darstellung von N,S-Di-[2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)-1-oxopropyl]-L-cystein-cyclohexylester

Setzt man N-(3-Nitratopivaloyl)-L-cystein-cyclohexylester anstelle des in Beispiel 1 beschriebenen N-(3-Nitratopivaloyl)-L-cystein-ethylester ein erhält man bei gleicher Reaktionsführung und Aufarbeitung ein viskoses, farbloses Öl von N,S-Di-(3-nitratopivaloyl)-L-cystein-cyclohexylester in 87,0%iger Ausbeute.

Elementaranalyse berechnet:

C 46.24%; H 6.33%; N 8.51%; O 32.42%; S 6.50%;

Elementaranalyse gefunden:

C 46.30%; H 6.35%; N 8.5%; O 32.3%; S 6.5%.

<sup>13</sup>C-NMR(CDCl<sub>3</sub>): 22.33, 22.50, 22.72, 22.82, 23.60, 25.24, 30.26, 31.35, 31.44, 41.94, 49.29, 52.70, 53.50, 74.96, 77.29, 78.01, 169.20, 174.14, 203.00.

### Beispiel 3

Darstellung von N-(Acetyl)-S-[2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)-1-oxopropyl]-L-cystein-cyclohexylester 15

Setzt man N-(Acetyl)-L-cystein-cyclohexylester anstelle des in Beispiel 1 beschriebenen N-(3-Nitratopivaloyl)-L-cystein-ethylester ein erhält man bei gleicher Reaktionsführung und Aufarbeitung ein farbloses Öl von N-(Acetyl)-S-(3-nitratopivaloyl)-L-cystein-cyclohexylester in 78,1%iger Ausbeute.

Elementaranalyse berechnet:

C 49.22%; H 6.71%; N 7.17%; O 28.68%; S 8.21%;

Elementaranalyse gefunden:

C 49.31%; H 6.68%; N 7.2%; O 28.6%; S 8.3%.

<sup>13</sup>C-NMR(CDCl<sub>3</sub>): 22.68, 22.94, 23.53, 25.23, 30.72, 31.29, 31.39, 49.24, 51.94, 74.81, 77.39, 169.53, 170.11, 202.08.

### Beispiel 4

Darstellung von N,S-Di-[2,2-dimethyl-3-nitrooxy]-1-oxopropyl]-L-cysteinamid 30

Setzt man N-(3-Nitratopivaloyl)-L-cysteinamid anstelle des in Beispiel 1 beschriebenen N-(3-Nitratopivaloyl)-L-cystein-ethylester ein erhält man bei gleicher Reaktionsführung und Aufarbeitung ein farbloses Öl von N,S-Di-(3-nitratopivaloyl)-L-cysteinamid in 68,3%iger Ausbeute.

Elementaranalyse berechnet:

C 36.22%; H 5.70%; N 15.84%; O 30.15%; S 12.09%;

Elementaranalyse gefunden:

C 36.29%; H 5.75%; N 15.7%; O 30.1%; S 12.0%.

<sup>13</sup>C-NMR(CDCl<sub>3</sub>): 22.20, 22.39, 22.61, 22.89, 30.25, 42.04, 49.32, 50.68, 53.17, 77.30, 78.30, 171.98, 175.08, 204.53.

### Beispiel 5

Darstellung von N,S-Di-[2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)-1-oxopropyl]-L-cystein-tert-butylester 45

Setzt man N-(3-Nitratopivaloyl)-L-cystein-tert-butylester anstelle des in Beispiel 1 beschriebenen N-(3-Nitratopivaloyl)-L-cystein-ethylester ein erhält man bei gleicher Reaktionsführung und Aufarbeitung ein farbloses Öl von N,S-Di-(3-nitratopivaloyl)-L-cystein-tert-butylester in 73,5%iger Ausbeute.

Elementaranalyse berechnet:

C 44.71%; H 6.88%; N 8.69%; O 29.78%; S 9.95%;

Elementaranalyse gefunden:

C 44.80%; H 6.79%; N 8.6%; O 29.8%; S 9.9%.

<sup>13</sup>C-NMR(CDCl<sub>3</sub>): 22.37, 22.44, 22.70, 22.84, 27.93, 30.34, 41.95, 49.29, 50.81, 52.91, 77.29, 78.04, 83.36, 168.83, 174.04, 202.71.

### Beispiel 6

Darstellung von N,O-Di-[2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)-1-oxopropyl]-L-serin-ethylester 60

Setzt man O-(3-Nitratopivaloyl)-L-serin-ethylester anstelle des in Beispiel 1 beschriebenen N-(3-Nitratopivaloyl)-L-cystein-ethylester ein erhält man bei gleicher Reaktionsführung und Aufarbeitung ein farbloses Öl von N,O-Di-(3-nitratopivaloyl)-L-serin-ethylester in 50,5%iger Ausbeute.

Elementaranalyse berechnet:

C 42.55%; H 5.95%; N 9.92%; O 41.57%;

Elementaranalyse gefunden:  
C 42.49%; H 5.96%; N 9.9%; O 41.5%.

$^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)$ : 14.14, 22.28, 22.39, 22.44, 42.03, 42.23, 52.60, 62.43, 64.03, 77.51, 77.99, 169.13, 174.07.

5

## Beispiel 7

## Darstellung von N-(Benzoyl)-S-[2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)-1-oxopropyl]-L-cystein-ethylester

10 Setzt man N-(Benzoyl)-L-cystein-ethylester anstelle des in Beispiel 1 beschriebenen N-(3-Nitratopivaloyl)-L-cystein-ethylester ein erhält man bei gleicher Reaktionsführung und Aufarbeitung (Eluent 70 Methanol und 30 entmineralisiertem Wasser V/V) ein farbloses Öl von N-(Benzoyl)-S-(3-intratopivaloyl)-L-cystein-ethylester in 95,8%iger Ausbeute.

15 Elementaranalyse berechnet:  
C 51.25%; H 5.57%; N 7.03%; O 28.11%; S 8.05%;  
Elementaranalyse gefunden:  
C 51.27%; H 5.51%; N 7.0%; O 28.2%; S 8.0%.

20  $^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)$ : 14.16, 22.69, 22.75, 30.70, 49.28, 52.59, 62.27, 77.29, 127.15, 128.68, 131.99, 133.49, 167.06, 170.16, 202.72.

## Beispiel 8

## 25 Darstellung von N-(Acetyl)-S-[2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)-1-oxopropyl]-L-cystein-ethylester

Setzt man N-(Acetyl)-L-cystein-ethylester anstelle des in Beispiel 1 beschriebenen N-(3-Nitratopivaloyl)-L-cystein-ethylester ein erhält man bei gleicher Reaktionsführung und Aufarbeitung (Eluent 70 Methanol und 30 entmineralisiertem Wasser V/V) ein farbloses Öl von N-(Acetyl)-S-(3-nitratopivaloyl)-L-cystein-ethylester in 84,3%iger Ausbeute.

30 Elementaranalyse berechnet:  
C 42.85%; H 5.99%; N 8.33%; O 33.30%; S 9.53%;  
Elementaranalyse gefunden:  
C 42.81%; H 5.92%; N 8.4%; O 33.3%; S 9.4%.

$^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)$ : 14.06, 22.64, 22.68, 22.94, 30.58, 49.21, 51.81, 62.09, 77.36, 169.97, 170.10, 202.17.

## Beispiel 9

40

## Darstellung von N-(Benzoyl)-O-[2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)-1-oxopropyl]-L-serin-ethylester

3.02 g (12,73 mmol) N-(Benzoyl)-L-serin-ethylester wurden in 20 ml Tetrahydrofuran gelöst und anschließend mit 2.31 g 3-Nitratopivaloylchlorid in 10 ml Tetrahydrofuran bei Raumtemperatur langsam versetzt, dabei fällt Triethylaminhydrochlorid aus. Zur Vervollständigung der Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde der ausgefallene Niederschlag abgesaugt. Das Filtrat wurde eingeeengt. Die Substanz wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel mit dem Eluenten Ethylacetat/η-Hexan 1/1 (V/V) gereinigt. Die das Titelprodukt enthaltene Fraktion wurde am Rotationsverdampfer bis zur Gewichtskonstanz eingeeengt, wobei ein farbloser öliger Rückstand von 3.2 g N-(Benzoyl)-O-(3-nitratopivaloyl)-L-serin-ethylester übrig bleibt (≈ 65.1% der Theorie).

50 Elementaranalyse berechnet:  
C 53.40%; H 5.80%; N 7.33%; O 33.47%;  
Elementaranalyse gefunden:  
55 C 52.35%; H 5.80%; N 7.4%; O 33.3%.

$^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)$ : 13.77, 21.86, 21.92, 41.82, 52.11, 61.87, 64.06, 77.20, 126.87, 128.28, 131.62, 133.21, 169.07, 173.70.

## Beispiel 10

60

## Darstellung von S-[2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)-1-oxopropyl]-2-mercaptobenzoessäure

7,7 g (50 mmol) 2-Mercaptobenzoessäure wurden in 40 ml Wasser suspendiert und durch Zugabe einer Lösung von 4,4 g (110 mmol) Natriumhydroxid in 40 ml Wasser aufgelöst. Anschließend wurden bei ca. 0°C eine Lösung von 10,9 g (60 mmol) 3-Nitratopivaloylchlorid in 10 ml Tetrahydrofuran zugetropft. Man läßt die Lösung auf Raumtemperatur aufwärmen, rührt 1,5 Stunden nach und säuert das Reaktionsgemisch mit einer Lösung von 10 ml konz. Salzsäure in 100 ml Wasser auf pH = 1 an. Das dabei ausgefallene Produkt wurde abgesaugt. Das getrocknete Rohprodukt (15,5 g) wurde in 20 ml Ethylacetat und 5 ml Tetrahydrofuran gelöst. Dabei unlösliche

Bestandteile wurden durch eine mit Kieselgel gefüllte Fritte abgesaugt und mit Ethylacetat nachgewaschen. Nach dem Einengen des Filtrats wurde aus 10 ml Ethylacetat und 20 ml  $\eta$ -Hexan umkristallisiert wobei man 10.5 g S-(3-Nitratopivaloyl)-2-mercaptobenzoessäure mit einem Schmelzpunkt von 116,2°C in 70,0%iger Ausbeute erhält.

Elementaranalyse berechnet:

C 48.16%; H 4.38%; N 4.68%; O 32.07%; S 10.71%;

Elementaranalyse gefunden:

C 48.20%; H 4.35%; N 4.7%; O 32.0%; S 10.6%.

$^{13}\text{C}$ -NMR( $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ , 1 : 1, V/V): 22.79, 50.08, 78.00, 127.75, 130.32, 131.66, 132.43, 136.36, 137.76, 169.10, 201.58.

#### Pharmakologische Daten

##### Hemmung der Thrombozytenaggregation in vitro

Der Thrombozytenaggregationsassay wurde an gewaschenen humanen Thrombozyten durchgeführt, welche, wie von Radomski M.W., et al., Thromb. Res. 30, 383—9 (1983) beschrieben, hergestellt wurden. Die Aggregation wurde von Kollagen ausgelöst und spektroskopisch in einem Aggregometer verfolgt. Die Thrombozytenaggregation wurde in Gegenwart verschiedener Nitrate bestimmt, wobei eine konzentrationsabhängige Hemmung der Aggregationsneigung gemessen wurde. Für jede Substanz wurde der  $\text{IC}_{50}$ -Wert ermittelt, welcher durch diejenige Konzentration der Testsubstanz definiert ist, bei der eine 50%ige Hemmung eintritt.

Nachfolgende Tabelle enthält die  $\text{IC}_{50}$ -Werte einer beispielhaft ausgewählten Verbindung sowie für die bekannten Verbindungen Isosorbid-5-mononitrat, 2,2-Dimethyl-3-(nitrooxy)-propansäure und N-[2,2-Dimethyl-3-(nitrooxy)-oxopropyl]-N-acetylglycyl-L-cystein-ethylester.

Tabelle 1

Substanz	Hemmung der Collagen-induzierten Thrombozytenaggregation an gewaschenen Plättchen $\text{IC}_{50}[\mu\text{M}]$
N,O-Di-[2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)-1-oxopropyl]-L-serin-ethylester	$5.9 \pm 1.2$
2,2-Dimethyl-3-(nitrooxy)-propansäure	$> 100$
N-[2,2-Dimethyl-3-(nitrooxy)-oxopropyl]-N-acetylglycyl-L-cystein-ethylester	79.3

Es ist offensichtlich, daß die erfindungsgemäße Verbindung eine deutlich stärkere Hemmung der Thrombozytenaggregation aufweist als die bekannten Verbindungen.

##### Wirkung auf den koronaren Perfusionsdruck am Langendorff-Herzen

Die Wirkung auf den Koronarflußanstieg bzw. die Reduktion des koronaren Perfusionsdrucks wurde an isoliert präparierten Rattenherzen (Langendorff-Präparation) untersucht. Die Herzen wurden mit oxygenierter (95%  $\text{O}_2$ /5%  $\text{CO}_2$ ) Krebs-Henseleislösung (pH = 7.4) bei 37°C perfundiert. Nach Erreichen eines stabilen basalen koronaren Perfusionsdrucks wurden Testsubstanzen in aufsteigenden Konzentrationen als kontinuierliche Infusionen zugegeben, wobei vor Gabe der nächsthöheren Konzentration das Erreichen einer stabilen Herzantwort abgewartet wurde. Der Zusatz eines Nitrats bewirkt hierbei eine Koronardilatation und somit ein Absinken des Koronarwiderstands bzw. Perfusionsdrucks. Es wurden die Resultate als prozentuale Reduktion des basalen koronaren Perfusionsdrucks ausgedrückt.  $\text{EC}_{10}$  ist die Testsubstanzkonzentration, die hierbei einen 10%igen Effekt bewirkt.

Tabelle 2

Substanz	Reduzierung des koronaren Perfusionsdrucks am isolierten Rattenherzen (Langendorffpräparation) $\text{EC}_{10}[\mu\text{M}]$
N,O-Di-[2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)-1-oxopropyl]-L-serin-ethylester	5
2,2-Dimethyl-3-(nitrooxy)-propansäure	400
N-[2,2-Dimethyl-3-(nitrooxy)-oxopropyl]-N-acetylglycyl-L-cystein-ethylester	20.0

## Patentanspruch

Organische Nitrate, dadurch gekennzeichnet, daß sie folgende Verbindungen darstellen:

5 N-Benzoyl-O-[2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)-1-oxopropyl]-L-serin-ethylester  
N,O-Di-[2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)-1-oxopropyl]-L-serin-ethylester  
N,S-Di-[2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)-1-oxopropyl]-L-cystein-ethylester  
N,S-Di-[2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)-1-oxopropyl]-L-cysteinamid  
N-Acetyl-S-[2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)-1-oxopropyl]-L-cystein-ethylester  
10 N,S-Di-[2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)-1-oxopropyl]-L-cystein-cyclohexylester  
N-Benzoyl-S-[2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)-1-oxopropyl]-L-cystein-ethylester  
N-Acetyl-S-[2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)-1-oxopropyl]-L-cystein-cyclohexylester  
S-[2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)-1-oxopropyl]-2-mercaptobenzoessäure  
N,S-Di-[2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)-1-oxopropyl]-L-cystein-tert.-butylester  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65